

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 09224672
PUBLICATION DATE : 02-09-97

APPLICATION DATE : 21-02-96
APPLICATION NUMBER : 08033973

APPLICANT : MITSUI GYOSAI SHOKUBUTSU BIO
KENKYUSHO:KK;

INVENTOR : OTA HIROYUKI;

INT.CL. : C12N 15/09 A01H 5/00 C07H 21/04
C07K 14/415 // C12N 5/10 C12Q 1/68

TITLE : DNA CODING NEW DNA-CONNECTED
PROTEIN

```

TCACAGAGCG CAACITTCGT CTCTATCCG CAACCCCTAAC CAGGTATCAI CTTCTAICT 60
TTCCCTAAAT TCAGTCAGTC AGAATATTG TCACITAAIT TCGAATTTTC ATTTCCGAGAG 120
TTGAGACTTA GACATGTTAA TTTCACITTT AGGGTGGAGG TTATCATCAA TCTTTCATT 180
TTCAATCTGA TGAATTGGAT TTGAATTTTC ATCTGTCACT TACCGAACGA TCGATTAGAG 240
TTTCGAGCGA GGATGAGTTC GAAAGAGCGA AGCAGCAGCC GCAATCGAGG GTTCCTCGTC 300
GTCAGGAGTG GATTCGTAGA CATCTTGGTG GTTGTCTCAA TCCAGAAAG CCCAAGAAG 360
GATCATCTTC GAATTCGAGG GAGCAGTCTA ATTTCCTCA GCTGTGCAA GAGATTGAGG 420
ACAAGCTCGT CAAAGGAGCT GTCGAATCC ATG AIT TGT TAT GAC ATG GTG CGC 473
Met Ile Cys Tyr Asp Met Val Arg
      1           5
      :
      :
      :
GGA GGG CAG CCT GCA CGA AAC TTT GAT GCT TTG GAA GCT TCT GAT GTA 3353
Gly Gly Gln Pro Ala Gly Asn Phe Asn Ala Leu Glu Ala Ser Asp Val
      955           960           965
GTA GAT GAT TGG GAG AAG GCT TGT GAA TAGCAAGGAG TAAACAATT 3400
Val Asp Asp Trp Glu Lys Ala Cys Glu
      970           975
TCATTTTATT TTGTTGAGAA GGAGGCAGAT TTGACTAGT GAAATGTCTA AGGCTCTTT 3460
TGTCCACTAG ATGTATCTCT TTTCATGTTT TATCCCCCTG ATTTTAATCA ATTTCCGATG 3520
TATTCTAA 3528

```

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a DNA as a cysteine-rich DNA connecting protein gene from a gene specifically generating after treating with a jasmonic acid.

SOLUTION: This DNA has an amino acid sequence of the formula and codes a DNA-connecting protein containable substitution, deletion, insertion, addition or transition of more than one amino acid as far as not substantially injuring a DNA connecting activity, and is, e.g., SJIP-2 as one of the gene obtained by a jasmonic acid treatment of a culturing cell of a soybean. The DNA connecting protein is considered as a factor controlling manifestation of a gene induced by jasmonic acid and is useful for producing a plant strong against a pathogenic fungus, producing a useful secondary metabolite and suppressing generation of a toxic secondary metabolite, etc.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-224672

(43)公開日 平成9年(1997)9月2日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 H 5/00			A 0 1 H 5/00	A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/415			C 0 7 K 14/415	
// C 1 2 N 5/10		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平8-33973

(22)出願日 平成8年(1996)2月21日

(71)出願人 591068458

株式会社三井農産植物バイオ研究所
東京都港区赤坂2-5-27 八千代ビル4
F

(72)発明者 柴田 大輔

茨城県つくば市千現2-1-6 つくば研
究支援センターD-6 株式会社三井農
産植物バイオ研究所内

(72)発明者 加藤 友彦

茨城県つくば市千現2-1-6 つくば研
究支援センターD-6 株式会社三井農
産植物バイオ研究所内

(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なDNA結合タンパク質をコードするDNA

(57)【要約】

【課題】 ジャスモン酸を用いた遺伝子の発現制御を行
うために、ジャスモン酸により誘導されるDNA結合タ
ンパク質をコードする遺伝子を単離する。【解決手段】 大豆の培養細胞にジャスモン酸処理を行
い、ジャスモン酸処理細胞と無処理の培養細胞から調製
したRNAからcDNAを合成し、各々をゲル電気泳動
し、ジャスモン酸処理細胞由来のcDNAのみに認めら
れ、無処理の培養細胞由来のcDNAには認められない
バンドをゲルから抽出することによって、DNA結合タ
ンパク質をコードしているDNAを得る。

110	C-PHLCVLCQHPGPCPPCKAFAPPRLCPC	137
155	CGQRCCQLLCGRHRCQQICHLGPCPCQVPINASCFC	192
219	CGSTCQKYLNCGNHICIECHPGSCGDCELLPSRIKTC	256
277	CSQVCGKYLPCGIHHCEEPCHAGDCSPCLVLVSQKCRC	314
373	CQLPCGKKLRGGHACESLCHSGHCPPCLETIFTDLTC	410
483	CNKLCGKTRQCGLHACGRTCHLPPCDNL SAVPGIRASC	520
531	C-RHTCTAPCH	540

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有し、DNA結合活性を実質的に害さない限り1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加又は転移を有してもよいDNA結合タンパク質をコードするDNA。

【請求項2】 配列表の配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号450～3480で表される塩基配列を有する請求項1記載のDNA。

【請求項3】 配列番号1に示す塩基配列に相補的な塩基配列の少なくとも一部を有するDNA。

【請求項4】 請求項1記載のDNAで形質転換された植物体。

【請求項5】 請求項3記載のDNAで形質転換された植物体。

【請求項6】 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有し、DNA結合活性を実質的に害さない限り1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加又は転移を有してもよいDNA結合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なDNA結合タンパク質遺伝子に関し、詳しくは、ジャスモン酸で特異的に誘導されるシステインーリッチなDNA結合タンパク質遺伝子およびその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】ジャスモン酸は、ジャスミンの花から得られるジャスミン油の香気成分の一つとして単離された物質であり、ジャガイモの塊茎形成、果実の成熟、植物の病原菌に対する抵抗反応、植物の成長阻害や葉の老化促進、気孔開閉制御などの生理作用を有することが知られている。また、ジャスモン酸によって発現が誘導される多くのタンパク質(jasmonate induced protein; JIP)が見い出され、遺伝情報物質としても知られており、ジャスモン酸を用いた遺伝子発現制御に関する研究も進められている。

【0003】上記のようなジャスモン酸によって誘導される遺伝子産物のなかには、プロテインゼインヒビター(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7713 (1990))、リボゾーム不活性化タンパク質(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7012 (1994))、植物貯蔵タンパク質(vegetative storage protein (Plant Sci. 62, 45 (1989))、リホキシゲナーゼ(Plant Cell Physiol. 34, 1063 (1993))、病原菌の攻撃に対する防御機構に関するタンパク質(Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 569 (1993))等のほか、植物の二次代謝産物(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 12505 (1995))が存在することが知られている。

【0004】そこで、これらのジャスモン酸で誘導される遺伝子の発現を制御することができれば、病原菌に対する防御物質を蓄積させたり、二次代謝産物の合成量を

増大もしくは減少させたりすることが可能となると考えられる。

【0005】ところで、遺伝子の発現調節には、プロモーター領域に結合するDNA結合タンパク質が関与していると考えられている。そこで遺伝子の発現を制御する1つの方法として、このようなDNA結合タンパク質遺伝子进行操作することが考えられる。すなわち、DNA結合タンパク質遺伝子の発現を自由にコントロールすることができれば、それによって調節されているさまざまな遺伝子の発現をコントロールすることができ、いろいろな現象を引き起こすことも可能になると思われる。

【0006】従って、ジャスモン酸により発現が誘導されるDNA結合タンパク質の遺伝子が単離されれば、それを利用することによって、ジャスモン酸により誘導を受ける遺伝子の発現をコントロールすることが可能となり、病原菌に強い植物あるいは二次代謝産物の量を増大・減少させた植物を作出することができると考えられる。

【0007】しかしながら、ジャスモン酸によって誘導されるDNA結合タンパク質及びその遺伝子は取得されて知られておらず、そのような遺伝子を利用してジャスモン酸により二次代謝産物の量を制御しようとする試みも当然なされていなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記観点からなされたものであり、ジャスモン酸による遺伝子の発現機構の解析、及びジャスモン酸を用いた遺伝子の発現制御を課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は、ジャスモン酸処理した後に特異的に出現する遺伝子について研究を行ったところ、そのような遺伝子の一つを単離することに成功し、その遺伝子がDNA結合タンパク質遺伝子であることを見出した。

【0010】具体的には、大豆の培養細胞にジャスモン酸処理を行い、ディファレンシャルディスプレイ法によりジャスモン酸で誘導される複数のcDNAクローンを単離し、塩基配列を決定した。そして、これらの内の1つは、ヒトのMHCクラスII遺伝子のプロモーター領域に保存されているX-boxに結合するシステインーリッチDNA結合タンパク質(Cystein-rich DNA-binding protein; NF-X1)とホモロジーがあることを明らかにし、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち本発明は、配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有し、DNA結合活性を実質的に害さない限り1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加又は転移を有してもよいDNA結合タンパク質、及びこれをコードするDNAである。ここで、「DNA結合活性」とは、具体的には、本発明のDNA結合タンパク質が遺伝子のプロモーター領域に結合して、その遺伝子の

発現制御に関与する性質である。

【0012】上記DNAとして具体的には、例えば配列表の配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号450～3480で表される塩基配列を有するDNAが挙げられる。尚、上記塩基配列に限らず、遺伝暗号の縮重による同一のアミノ酸配列をコードする異なった塩基配列を有するDNAも本発明のDNAに含まれる。

【0013】本発明はまた、配列番号1に示す塩基配列（センス配列）に相補的な塩基配列（アンチセンス配列）の少なくとも一部を有するDNAを提供する。さらに本発明は、上記センス配列またはアンチセンス配列を有するDNAで形質転換された植物体を提供する。

【0014】本発明のDNA結合タンパク質は、NF- κ Bタンパク質と相同性を有している。NF- κ Bタンパク質は、ヒトのMHC（major histocompatibility complex, MHC: 主要組織適合遺伝子複合体）クラスII遺伝子のプロモーター領域に保存されているN-bboxに結合するタンパク質であり、同遺伝子を制御するリプレッサーとして働いていることが報告されている(J. Exp. Med. 180, 1763 (1994))。尚、上記MHCクラスII遺伝子は、初めには同種移植片生着の可否を支配する遺伝子として同定され、ついで個体や系の免疫応答性の差を決定する遺伝子であることが証明されており、動物の免疫システムにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになっている。

【0015】本発明のDNA結合タンパク質の遺伝子は、cDNAをプローブとして発現解析を行ったところ、ジャスモン酸によって特異的に誘導されることが確認された。

【0016】ジャスモン酸は、二次代謝産物の生合成などさまざまな植物の反応に関与しており、多くの遺伝子の発現を制御する情報伝達物質としての機能を有している。本発明のDNA結合タンパク質は、これらのジャスモン酸で誘導される遺伝子の発現を調節する因子であると考えられる。したがって、それらの遺伝子の発現をコントロールすることが可能となり、病原菌に対する防御物質を蓄積させたり、二次代謝産物の合成量を増大、減少させたりすることできると考えられる。具体的には、本発明のDNAを植物中で発現させたり、本発明のDNAのアンチセンス遺伝子を植物中で発現させることによって、病原菌に強い植物の作出、有用な二次代謝産物の生産、有毒な二次代謝産物の生成の抑制などを行うことが可能であると期待される。

【0017】本発明により、ジャスモン酸によって誘導されるDNA結合タンパク質をコードするDNAが得られたので、この配列もしくはこの配列を基に作製したオリゴヌクレオチドをプローブに用いたハイブリダイゼーション法、あるいは前記オリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR（ポリメラーゼ・チェイン・リアクション）法によって、植物染色体DNAから、DNA結合タ

ンパク質遺伝子を単離することができる。この遺伝子自体も、ジャスモン酸によって発現誘導されるので、該遺伝子産物のみならず、そのプロモーターも、植物体内における遺伝子発現調節に利用できる。

【0018】

【発明の実施の形態】次に、本発明の実施の形態を説明する。本発明のDNAは、塩基配列及びそれによってコードするアミノ酸配列が明らかとなったので、そのアミノ酸配列に基づいて合成し、あるいは前記塩基配列に基づいて作製した1組のオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR法、あるいは前記塩基配列をもとに作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーション法により、植物の染色体DNA、mRNA又はcDNAから単離することができる。尚、染色体DNAからPCR法による増幅によって本発明のDNA結合タンパク質の遺伝子を得た場合には、イントロンが含まれている可能性が高いが、そのような1つあるいは2以上のイントロンを内部に含むものも、本発明のDNAに含まれる。

【0019】上記の方法の中では、PCR法が好ましいが、本発明を完成するに際しては、本発明のDNAはディファレンシャルディスプレイ法（Science 257, 967 (1992)）によるcDNAクローニングによって得られたものである。

【0020】本発明のDNAは、植物細胞、例えば大豆の培養細胞からジャスモン酸によって特異的に誘導されるcDNAを単離することによって得られる。具体的には、ジャスモン酸処理した培養細胞と無処理の培養細胞からRNAを抽出し、ディファレンシャルディスプレイ法（Science 257, 967 (1992)）を行って、ジャスモン酸処理した培養細胞のみから得られるcDNAを単離する。すなわち、ジャスモン酸処理細胞と無処理の培養細胞から調製したRNAからcDNAを合成し、各々をゲル電気泳動し、ジャスモン酸処理細胞由来のcDNAのみに認められ、無処理の培養細胞由来のcDNAには認められないバンドをゲルから抽出することによって、ジャスモン酸によって誘導される遺伝子由来のcDNAが得られる。

【0021】上記のようにして得られたcDNAの塩基配列を決定し、コード領域全長を含んでいないと認められる場合には、得られたcDNAをプローブとするコロニーハイブリダイゼーション又はアークハイブリダイゼーションによって、植物細胞由来のcDNAライブラリーから、ハイブリダイゼーション陽性のクローンをスクリーニングすればよい。

【0022】cDNAライブラリーは、植物組織からmRNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、ポリメラーゼ反応によって2本鎖化したものをベクターに挿入し、大腸菌等に形質転換することにより作製することができる。cDNAクローニングキットが市販

されているのでこれらを使用してもよい。

【0023】ライブラリーの作製に用いるベクターは、多数種市販されており、これらを使用することができる。DNAの切断、連結、形質転換、遺伝子の塩基配列の決定、ハイブリダイゼーション等一般の遺伝子組換えに必要な方法は、各操作に使用する市販の酵素等に添付されている説明書や、Molecular cloning (Maniatis T. et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載されている。

【0024】上記のようにしてハイブリダイゼーション陽性のクローンが得られたら、その塩基配列決定を行う。塩基配列の決定は、Maxam-Gilbert法あるいは、ダイデオキシ法により行う。ダイデオキシ法による塩基配列の決定は、市販されているキットを用いて行うことができ、配列決定を自動的に行うオートシーケンサーを使用してもよい。

【0025】上記のようにして得られた本発明のDNAの塩基配列を配列番号1に示す。また、この塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、配列番号2に示す。このアミノ酸配列について、データベース解析を行ったところ、このアミノ酸配列の1～771までの部分は、ヒトのMHCクラスII遺伝子のプロモーター領域に保存されているX-boxに結合するシステインリッチDNA結合タンパク質(Cystein-rich DNA-binding protein (NF-X1))のアミノ酸配列の343～1087までの部分との間で39.7%のホモロジーがあることがわかり、DNA結合タンパク質であることが示された。尚、配列番号1において、塩基番号450～452のATGを開始コドンとしてコード領域を示してあるが、これは、このコドンが開始コドンである可能性が最も高いことを意味するものであり、上流にコード領域が続くことを完全に否定するものではない。ただし、NF-X1との相溶性から、配列番号2に示すアミノ酸配列は、DNA結合タンパクとしての活性を示すのに十分であると考えられる。

【0026】上記DNA結合タンパク質の遺伝子を、SJIP-2と命名した。この遺伝子の発現様式を調べるために、ノーザン解析を行った。すなわち、ジャスモン酸処理した細胞と無処理の細胞からRNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動を行い、ゲルからRNAをメンブランに移した。先に得られたcDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行ったところ、SJIP-2は無処理の細胞では発現が見られず、ジャスモン酸処理した細胞で特異的に発現していることが明らかとなった。したがって、上記SJIP-2は、ジャスモン酸で特異的に誘導されるDNA結合タンパク質の遺伝子であることが明らかとなった。

【0027】本発明により、ジャスモン酸で特異的に誘導されるDNA結合タンパク質のcDNAが得られたので、この配列を用いたハイブリダイゼーションにより染

色体DNAライブラリーから、あるいはこのcDNA配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR法により、染色体DNAからSJIP-2を単離することができる。

【0028】本発明のDNA又はSJIP-2の全部あるいは一部をカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターなど植物で発現可能なプロモーターと結合し、これを含む組換えDNAを植物に導入して形質転換することによって、DNA結合タンパク質を高発現する植物を作製することが出来る。また、本発明のDNA又はSJIP-2の全部又は一部を、逆方向にプロモーターに結合したものを植物に導入し、いわゆるアンチセンスRNAを発現させることによって、DNA結合タンパク質mRNAの翻訳を阻害し、発現量を抑制させることができる。

【0029】植物の形質転換は、パーティクルガン法、エレクトロポレーション(電気的穿孔法)あるいはアグロバクテリウムのTiプラスミドを利用する方法などによって、プロトプラストにDNAを導入することによって行うことができる。

【0030】SJIP-2のセンス又はアンチセンス遺伝子が導入されたクローンの選択は、形質転換細胞から得られたカルスあるいは植物体の細胞を採り、サザンハイブリダイゼーション等の方法で確認することにより行えばよい。また、再生後に、植物体の葉からRNAを抽出し、DNA結合タンパク質遺伝子の発現をノーザン解析等により調べる一方、SJIP-2が導入されていることをサザン解析等により確認することが好ましい。

【0031】

【実施例】以下に本発明を実施例に基づいて詳細に説明する。

<1>ジャスモン酸処理により特異的に発現するcDNAのディフェレンシャルディスプレイ法による単離
大豆の培養細胞(SB-P cells, Jack M. Widholm教授より提供された, Plant Physiol. 72, 426 (1983)参照)を20μMのジャスモン酸メチルエステルおよび100μMのシクロヘキシミドで30分間処理し、デ・ノボのタンパク質合成を阻害しつつジャスモン酸で誘導されるmRNAを生成させた後、ジャスモン酸処理細胞および無処理の細胞から、以下に示すようにしてグアニジンチオシアネート-CsCl法によりRNAを抽出した。

【0032】培養細胞それぞれ約1gづつを液体窒素中で粉碎し、それを1.4mlの4Mグアニジンチオシアネート、117mMメルカプトエタノール、25mM酢酸ナトリウム溶液に入れ、ホリトロンホモジナイザーで完全に粉碎した。これを、13,000×gで25分間遠心したのち、上清を遠心チューブ内の1.5mlの5.7M CsCl溶液上に重層した。これを、182,000×gで20時間遠心した後、上清を除いた。沈殿をTE緩衝液に溶かして全RNAとした。

【0033】次に、それぞれのRNAを用いて、Gne Hunter社のRNAmappingキットを用いてディファレンシャルディスプレイ法を行った。PCRのプライマーは配列番号3～6に示す4種類のオリゴdTプライマー（各配列において、VはG、A、Cが混合されていることを示す）と、20種類の10マーのランダム配列を有するプライマーを組み合わせて使用した。これらのプライマーはいずれも前記キットに含まれている。

【0034】上記のRNA 0.2 μ gを鋳型として、逆転写酵素（MLV(Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase)を用いてcDNAを合成した後、上記のプライマーを加え、94℃ 30秒、40℃ 2分、72℃ 30秒からなる増幅反応を40サイクル行った。尚、反応液に、 $[^{32}\text{S}]$ -dATPを加えて、増幅産物に $[^{32}\text{S}]$ -dATPを取り込ませた。

【0035】それぞれの反応産物を、シークエンスゲル（塩基配列決定用ゲル）を用いて電気泳動を行い、オートラジオグラムをとった後、ジャスモン酸処理に特異的に出現するバンドを調べた。ジャスモン酸処理した細胞由来のRNAから増幅され、無処理の細胞由来のRNAからは増幅されなかったDNAのバンドをゲルから切り出し、TE緩衝液中でボーリングしてゲル断片からDNAを抽出した。得られたDNAをもとに、初めの反応と同じプライマーを用いてPCRを行い、DNAを増幅した。増幅されたDNAは、pCRIIベクター（Invitrogen社製）にサブクローニングし、以後の解析に用いた。

【0036】＜2＞長鎖cDNAの単離
大豆の培養細胞を50 μ Mのジャスモン酸で1時間処理し、グアニジンチオシアネート・CsCl法により全RNAを抽出した。得られた全RNAからmRNA調製キット（mRNA Purification Kit(Pharmacia社製)）を用いてポリA⁺-RNAを調製した。次いで、4 μ gのポリA⁺-RNAからcDNA合成キット（cDNA Synthesis Kit (Pharmacia社製)）を用いてcDNAを合成した。

【0037】得られたcDNAを、 λ ZAPIIベクター（Stratagene社製）に挿入し、インビトロ・パッケージングを行って入ファージによるcDNAライブラリーを作製した。

【0038】前記＜1＞のディファレンシャルディスプレイ法により単離した1つのクローンT6-1を ^{32}P で標識し、上記のcDNAライブラリー80,000プラークをプラークハイブリダイゼーション法によりスクリーニングして、陽性クローンを得た。ハイブリダイゼーションを60℃で16時間行った後、0.2 \times SSC、0.1% SDS溶液中60℃で10分間洗浄した。得られたクローンのうち最も長いクローンをT6-1-20とし、さらに解析を行った。

【0039】＜3＞塩基配列の決定

T6-1-20の塩基配列を、塩基配列決定キット（BeaBEST Dideoxy Sequence Kit（宝酒造(株)製））を用いて

ジデオキシ法により決定したところ、このcDNAは3,528bpからなり、977アミノ酸をコードする1つのオープンリーディングフレームが見出された。そして、このcDNAがコードするアミノ酸配列についてデータベース検索を行ったところ、このアミノ酸配列の1～771までの部分と、ヒトのMHCクラスII遺伝子のプロモーター領域に保存されているX-boxに結合するシステイン-リッチDNA結合タンパク質（Cysteine-rich DNA-binding protein (NF-X1)）のアミノ酸配列の343～1087までの部分との間で39.7%のホモロジーがあることがわかった。

【0040】このNF-X1は、MHCクラスII遺伝子の発現を調節しているリプレッサーとして機能していることが示されており、遺伝子の中央部分にシステインに富む7回の繰返し構造をもつ新たなファミリーであるとして報告されている。今回単離した大豆の遺伝子は、システインに富む7回の繰返し構造を有しており（図1）、システイン-リッチDNA結合タンパク質をコードしていることが示された。このcDNAが由来する遺伝子を、SJIP-2とした。

【0041】＜4＞SJIP-2の発現解析
システイン-リッチDNA結合タンパク質をコードする遺伝子（SJIP-2）の発現様式を調べるために、ジャスモン酸処理した大豆培養細胞と無処理の細胞からRNAを抽出し、T6-1（200bp）をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

【0042】RNAの抽出は、グアニジンチオシアネート・フェノールクロロホルム法により行った。1.6mlの4.23Mグアニジンチオシアネート、2.5mMクエン酸ナトリウム溶液と、0.2mlの20%サルコシル溶液と、0.2mlの2-メルカプトエタノール溶液と、2mlのフェノール・クロロホルム溶液とを混合し、この混合溶液に培養細胞約1.5gを加え、培養細胞を粉碎した。これを、3,000rpmで10分間遠心を行い、上清をフェノール・クロロホルムで抽出した後、さらにクロロホルムで抽出を行った。得られた溶液にエタノールを加えてRNAを沈殿させた後、沈殿を1mlの水に溶解し、250 μ lの10M LiCl溶液を加えて4℃で2時間以上静置した。これを遠心してRNAの沈殿を回収した。

【0043】上記のようにして得られたRNA 20 μ gをアガロースゲルで電気泳動した後、RNAをナイロンメンブランに移した。T6-1を ^{32}P で標識してプローブとし、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションを60℃で16時間行い、0.2 \times SSC、0.1% SDS溶液中60℃で30分間洗浄を行った後、X線フィルムを用いてオートラジオグラムをとった。

【0044】その結果、SJIP-2は、ジャスモン酸無処理の細胞では発現が見られず、ジャスモン酸処理し

た細胞で特異的に発現していることが明らかとなった。
したがってこのS J I P-2は、ジャスモン酸で特異的に誘導されるDNA結合タンパク質の遺伝子であることが明らかとなった。

【0045】

【発明の効果】本発明のDNAは、ジャスモン酸で誘導されるDNA結合タンパク質をコードする。このDNA結合タンパク質は、ジャスモン酸で誘導される遺伝子の発現を調節する因子であると考えられる。したがって、それらの遺伝子の発現をコントロールすることが可能となり、病原菌に強い植物の作出、有用な二次代謝産物の生産、有毒な二次代謝産物の生成の抑制などに利用することができる。と期待される。

【0046】

【配列表】

配列番号：1
配列の長さ：3528
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：cDNA
起源
生物名：ダイズ
株名：SB-P
配列の特徴
特徴を表す記号：CDS
存在位置：450..3480
特徴を決定した方法：P

配列

TCACACAGCG CAACTTTTCTG CTTCTATCCC CAACCCCTAAC CAGGTATCAT CTTCTATCT	60
TTCTCTAAATT TCAGTCAGTC AGAATATTTG TCACTTAATT TGGAATTTTC ATTTGAGAG	120
TTGAGACTTA GACATGTTAA TTTGACTTTT AGGGTTGAGG TTATCATCAA TCTTTCCATT	180
TTCAATCTGA TGAATTGGAT TTGAATTTTC ATGTGTGAGT TAGCGAACGA TCGATTAGAG	240
TTTCGACGCA GGATGAGTTC GAAAGAGCGA AGCAGCAGCC GCATTCGAGG GTTCCTCGTC	300
GTCAGGAGTG GATTCGTAGA GATGTTGGTG GTTGCTCCAA TCCAAGAAAG CCAAGAAGG	360
GATCATCTTC GAATTCGAGG GAGGAGTCTA ATTTGCTCA GCTGCTGCAA GAGATTCAGG	420
ACAAGCTCGT CAAAGGAGCT GTCGAATGC ATG ATT TGT TAT GAC ATG GTG CGC	473
Met Ile Cys Tyr Asp Met Val Arg	
1 5	
AGG TCT GCG CCT ATC TGG TCT TGC TCC GGT TGC TTC TCT ATC TTT CAC	521
Arg Ser Ala Pro Ile Trp Ser Cys Ser Gly Cys Phe Ser Ile Phe His	
10 15 20	
CTC ACT TGT ATC AAG AAG TGG GCT CGT GCA CCC ATT TCT GTG GAT TTG	569
Leu Thr Cys Ile Lys Lys Trp Ala Arg Ala Pro Ile Ser Val Asp Leu	
25 30 35 40	
TCC GTT GAG AAG AAC CAG GGC GGC TTC AAT TGG CGT TGC CCT GGT TGC	617
Ser Val Glu Lys Asn Gln Gly Gly Phe Asn Trp Arg Cys Pro Gly Cys	
45 50 55	
CAG TCT GTG CAG CTC ACT TCA TCC AAG GAT ATT AGG TAT CTA TGC TTC	665
Gln Ser Val Gln Leu Thr Ser Ser Lys Asp Ile Arg Tyr Leu Cys Phe	
60 65 70	
TGT GGA AAG AGG CCA GAT CCA CCC TCT GAT TTG TAT CTC ATG CCA CAT	713
Cys Gly Lys Arg Pro Asp Pro Pro Ser Asp Leu Tyr Leu Met Pro His	
75 80 85	
TCC TGT GGA GAA CCA TGT GGC AAG CCT CTT GAG AGG GAC CTT CAA GGG	761
Ser Cys Gly Glu Pro Cys Gly Lys Pro Leu Glu Arg Asp Leu Gln Gly	
90 95 100	
GAT AAG GAG CTT CTT TGC CCT CAT CTT TGT GTC TTG CAA TGC CAT CCC	809
Asp Lys Glu Leu Leu Cys Pro His Leu Cys Val Leu Gln Cys His Pro	
105 110 115 120	
GGC CCC TGT CCT CCT TGC AAA GCA TTT GCC CCT CCA CGT CTG TGT CCT	857
Gly Pro Cys Pro Pro Cys Lys Ala Phe Ala Pro Pro Arg Leu Cys Pro	
125 130 135	
TGT GGG AAG AAA AAT ATT ACC ACT CGT TGC TCT GAC CGC CAG TCT GTT	905

Cys Gly Lys Lys Asn Ile Thr Thr Arg Cys Ser Asp Arg Gln Ser Val	
140 145 150	
CTT ACC TGT GGC CAG CGC TGC CAA AAG CTT CTT CAA TGT GGC CGT CAT	953
Leu Thr Cys Gly Gln Arg Cys Gln Lys Leu Leu Gln Cys Gly Arg His	
155 160 165	
CGC TGT CAG CAA ATC TGT CAT CTG GGT CCT TGT CAT CCT TGT CAA GTT	1001
Arg Cys Gln Gln Ile Cys His Leu Gly Pro Cys His Pro Cys Gln Val	
170 175 180	
CCA ATC AAT GCC TCT TGC TTT TGT GCC CAA AAG ATG GAG GTA ATT CTT	1049
Pro Ile Asn Ala Ser Cys Phe Cys Ala Gln Lys Met Glu Val Ile Leu	
185 190 195 200	
TGT GGG GAG ATG GCT GTC AAG GGT GAA ATC AGA GCA GAT GGT GGA GTA	1097
Cys Gly Glu Met Ala Val Lys Gly Glu Ile Arg Ala Asp Gly Gly Val	
205 210 215	
TTC TCT TGT GGT TCC ACT TGT CAA AAG AAA CTT AAT TGT GGT AAT CAT	1145
Phe Ser Cys Gly Ser Thr Cys Gln Lys Lys Leu Asn Cys Gly Asn His	
220 225 230	
ATC TGT ATC GAG ACT TGT CAT CCA GGT AGC TGT GGG GAC TGT GAA TTA	1193
Ile Cys Ile Glu Thr Cys His Pro Gly Ser Cys Gly Asp Cys Glu Leu	
235 240 245	
TTA CCA TCC CGT ATT AAG ACA TGC TGT TGT GGG AAA ACT AGA TTG GAG	1241
Leu Pro Ser Arg Ile Lys Thr Cys Cys Cys Gly Lys Thr Arg Leu Glu	
250 255 260	
GAG AAA CGC CAC AGT TGT TTA GAC CCA ATT CCT ACC TGT TCA CAA GTA	1289
Glu Lys Arg His Ser Cys Leu Asp Pro Ile Pro Thr Cys Ser Gln Val	
265 270 275 280	
TGT GGC AAG TAC CTT CCT TGC GGG ATT CAT CAT TGT GAA GAG CCA TGC	1337
Cys Gly Lys Tyr Leu Pro Cys Gly Ile His His Cys Glu Glu Pro Cys	
285 290 295	
CAT GCT GGG GAT TGT TCT CCT TGT CTG GTT CTA GTT TCT CAG AAG TGT	1385
His Ala Gly Asp Cys Ser Pro Cys Leu Val Leu Val Ser Gln Lys Cys	
300 305 310	
AGA TGT GGC TCG ACT TCC CGA ACT GTG GAG TGT TGC AAG ACA AAA ATG	1433
Arg Cys Gly Ser Thr Ser Arg Thr Val Glu Cys Cys Lys Thr Lys Met	
315 320 325	
GAA AAT GAG AAA TTT ACT TGT GAA AGG CCT TGT GGG CAG AAA AAG AAT	1481
Glu Asn Glu Lys Phe Thr Cys Glu Arg Pro Cys Gly Gln Lys Lys Asn	
330 335 340	
TGT GGA AGG CAT CGA TGT AGT GAA AGG TGT TGT CCA CTT TCT AAT CCA	1529
Cys Gly Arg His Arg Cys Ser Glu Arg Cys Cys Pro Leu Ser Asn Pro	
345 350 355 360	
AAT AAT ATT CTA AAT GCA GAT TGG GAT CCA CAC TTC TGT CAA TTG CCG	1577
Asn Asn Ile Leu Asn Ala Asp Trp Asp Pro His Phe Cys Gln Leu Pro	
365 370 375	
TGT GGA AAG AAG TTA AGG TGT GGG CAG CAT GCA TGT GAA TCC CTG TGC	1625
Cys Gly Lys Lys Leu Arg Cys Gly Gln His Ala Cys Glu Ser Leu Cys	
380 385 390	
CAC AGT GGT CAT TGT CCA CCT TGT CTT GAA ACT ATA TTT ACT GAT TTG	1673
His Ser Gly His Cys Pro Pro Cys Leu Glu Thr Ile Phe Thr Asp Leu	
395 400 405	

ACA TGT GCT TGT GGT AAG ACT TCA ATC CCT CCT CCA TTG CCT TGT GGC Thr Cys Ala Cys Gly Lys Thr Ser Ile Pro Pro Pro Leu Pro Cys Gly 410 415 420	1721
ACA CCG CCT CCC TCA TGT CAG CTT CCA TGT TCA GTT CCT CAG CCT TGT Thr Pro Pro Pro Ser Cys Gln Leu Pro Cys Ser Val Pro Gln Pro Cys 425 430 435 440	1769
TCG CAT CCA GCC TCT CAC AGC TGT CAT TTT GGA GAT TGC CCT CCT TGT Ser His Pro Ala Ser His Ser Cys His Phe Gly Asp Cys Pro Pro Cys 445 450 455	1817
TCA ATG CCC ATA GCA AAA GAA TGT ATT GGT GGA CAT GTA GTT CTT AGG Ser Met Pro Ile Ala Lys Glu Cys Ile Gly Gly His Val Val Leu Arg 460 465 470	1865
AAC ATA CCT TGT GGT TCG AAG GAT ATT AAA TGC AAT AAA CTC TGT GGG Asn Ile Pro Cys Gly Ser Lys Asp Ile Lys Cys Asn Lys Leu Cys Gly 475 480 485	1913
AAG ACC AGA CAG TGT GGT TTA CAT GCA TGT GGC AGA ACA TGT CAC CTC Lys Thr Arg Gln Cys Gly Leu His Ala Cys Gly Arg Thr Cys His Leu 490 495 500	1961
CCC CCT TGT GAT AAT CTG TCA GCT GTG CCA GGT ATC CGA GCC TCT TGT Pro Pro Cys Asp Asn Leu Ser Ala Val Pro Gly Ile Arg Ala Ser Cys 505 510 515 520	2009
GGG CAA ACA TGT GGT GCT CCT AGG AGA GAC TGC CGG CAT ACA TGT ACA Gly Gln Thr Cys Gly Ala Pro Arg Arg Asp Cys Arg His Thr Cys Thr 525 530 535	2057
GCT CCT TGT CAC CCT TCA ACT CCA TGT CCA GAT ACA AGA TGC AAA TTC Ala Pro Cys His Pro Ser Thr Pro Cys Pro Asp Thr Arg Cys Lys Phe 540 545 550	2105
CCT GTC ACA ATT ACT TGT TCT TGT GGC CGA ATA ACA GAA AAT GTT CCT Pro Val Thr Ile Thr Cys Ser Cys Gly Arg Ile Thr Glu Asn Val Pro 555 560 565	2153
TGT GAT GCT GGT GGC AGT TGT GCT AAT TAT GAT GCT GAT ACT GTA CAT Cys Asp Ala Gly Gly Ser Cys Ala Asn Tyr Asp Ala Asp Thr Val His 570 575 580	2201
GAA GCT TCC ATT ATT CAA AAG TTG CCT GTG CTT CTT CAA CCC GTG GCT Glu Ala Ser Ile Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Leu Gln Pro Val Ala 585 590 595 600	2249
GCA AAT GGC AAA AAA GTC CCC CTC GGA CAA AGA AAA CTG ATG TGT AAT Ala Asn Gly Lys Lys Val Pro Leu Gly Gln Arg Lys Leu Met Cys Asn 605 610 615	2297
GAT GAC TGT GCT AAG TTA GAG CGG AAA AGG GTT CTT GCA GAT GCT TTT Asp Asp Cys Ala Lys Leu Glu Arg Lys Arg Val Leu Ala Asp Ala Phe 620 625 630	2345
GAG ATT ACC GCT CCA AAT CTG GAT TCA CTC CAT TTT GGT GAG AAT TCG Glu Ile Thr Ala Pro Asn Leu Asp Ser Leu His Phe Gly Glu Asn Ser 635 640 645	2393
GTT GCT TCT GAA TTG CTG GCT GAC ATG TTG AGA CGT GAT TCT AAA TGG Val Ala Ser Glu Leu Leu Ala Asp Met Leu Arg Arg Asp Ser Lys Trp 650 655 660	2441
GTT TTA TCT GTT GAA GAG AGA TGC AAG TTT TTA GTA CTT GGC AAG AGC Val Leu Ser Val Glu Glu Arg Cys Lys Phe Leu Val Leu Gly Lys Ser	2489

665	670	675	680	
AGA GGA AAT GCA CAT GGT CCA AAA GTC CAT GTT TTC TGT CCT ATG TTA				2537
Arg Gly Asn Ala His Gly Pro Lys Val His Val Phe Cys Pro Met Leu				
	685	690	695	
AAG GAC AAA AGA GAT GCA GTG AGG GTG ATT GCT GAG AGA TGG AAG CTT				2585
Lys Asp Lys Arg Asp Ala Val Arg Val Ile Ala Glu Arg Trp Lys Leu				
	700	705	710	
GCA GTG AAT GCA GCT GGT CGG GAG CCA AAG CAT TTC GTA GTT GTT CAT				2633
Ala Val Asn Ala Ala Gly Arg Glu Pro Lys His Phe Val Val Val His				
	715	720	725	
GTT ACA CCA AAA TCA AGA GCT CCT GCT CGT GTG CTA GGG TTT AAG GGT				2681
Val Thr Pro Lys Ser Arg Ala Pro Ala Arg Val Leu Gly Phe Lys Gly				
	730	735	740	
ACT ACA ACT GTA AAT GTA CCC CTT CCT CCG GCA TTT GAT CCT TTG GTT				2729
Thr Thr Thr Val Asn Val Pro Leu Pro Pro Ala Phe Asp Pro Leu Val				
	745	750	755	760
GAT ATG GAT CCT CGA CTT GTT GTC TCT TTT ATA GAC TTA CCA ATG GAT				2777
Asp Met Asp Pro Arg Leu Val Val Ser Phe Ile Asp Leu Pro Met Asp				
	765	770	775	
GCA GAT ATT AGT GCA TTG GTG TTG AGA TTT GGT GGT GAG TGT GAA CTT				2825
Ala Asp Ile Ser Ala Leu Val Leu Arg Phe Gly Gly Glu Cys Glu Leu				
	780	785	790	
GTT TGG TTA AAT GAC AAA AAT GCA TTG GCC GTT TTT AAT GAC CCT GCC				2873
Val Trp Leu Asn Asp Lys Asn Ala Leu Ala Val Phe Asn Asp Pro Ala				
	795	800	805	
CGT GCT GCA ACT GCA ATG AGG AGG TTG GAT CAT GGT ACG GTT TAT CAG				2921
Arg Ala Ala Thr Ala Met Arg Arg Leu Asp His Gly Thr Val Tyr Gln				
	810	815	820	
GGA GCT GTG GTG GTG GTT GTT CCA AAT GTC GGG GCA TCA GTA GCA TCT				2969
Gly Ala Val Val Val Val Val Pro Asn Val Gly Ala Ser Val Ala Ser				
	825	830	835	840
TCA GCT ACC AAT GCC TGG GGA GGA TCT GGG ACA ATG AAA GGA GGA GCA				3017
Ser Ala Thr Asn Ala Trp Gly Gly Ser Gly Thr Met Lys Gly Gly Ala				
	845	850	855	
CTG GCA GCA TTA AAG AGT AAT CCA TGG AAA AAG GAT GTT ATT CAA GAG				3065
Leu Ala Ala Leu Lys Ser Asn Pro Trp Lys Lys Asp Val Ile Gln Glu				
	860	865	870	
CCA GGT TGG AGA GAA GAT GCT TGG GGT GAT GAG GAG TGG GCT ACT GGT				3113
Pro Gly Trp Arg Glu Asp Ala Trp Gly Asp Glu Glu Trp Ala Thr Gly				
	875	880	885	
TCT GCT AAT GTC AAA TTG CCT ATT CAG AAG AAA GAA GCC CGA ATA TCT				3161
Ser Ala Asn Val Lys Leu Pro Ile Gln Lys Lys Glu Ala Arg Ile Ser				
	890	895	900	
GCT TCA GTA AAT CCT TGG AGT GTC CTA AAT CAA GAA TCG TCT TCA AGT				3209
Ala Ser Val Asn Pro Trp Ser Val Leu Asn Gln Glu Ser Ser Ser Ser				
	905	910	915	920
TCA TCT GTT GCA GCC ATT AAA ATT GAT GGT TCT AGG AAA CAC TCT GAA				3257
Ser Ser Val Ala Ala Ile Lys Ile Asp Gly Ser Arg Lys His Ser Glu				
	925	930	935	
AGT AGT GTT ATC ACA AAG TTG GAG CCT CGT GAT GGT GGT TCA AAT CTA				3305

Ser Ser Val Ile Thr Lys Leu Glu Pro Arg Asp Gly Gly Ser Asn Leu	
940 945 950	
GGA GGG CAG CCT GCA GGA AAC TTT GAT GCT TTG GAA GCT TCT GAT GTA	3353
Gly Gly Gln Pro Ala Gly Asn Phe Asp Ala Leu Glu Ala Ser Asp Val	
955 960 965	
GTA GAT GAT TGG GAG AAG GCT TGT GAA TAGCAAGGAG TAAACATTTT	3400
Val Asp Asp Trp Glu Lys Ala Cys Glu	
970 975	
TCATTTTATT TTGTTGAGAA GGAGGCAGAT TTTGACTAGT GAAATGTCTA AGGCTCTTTT	3460
TGTCCACTAG ATGTATCTCT TTTTCATGTTT TATCCCCCTG ATTTTAATCA ATTTGATGT	3520
TATTCTAA	3528

【0047】配列番号：2

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：977

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

配列

Met Ile Cys Tyr Asp Met Val Arg Arg Ser Ala Pro Ile Trp Ser Cys	
1 5 10 15	
Ser Gly Cys Phe Ser Ile Phe His Leu Thr Cys Ile Lys Lys Trp Ala	
20 25 30	
Arg Ala Pro Ile Ser Val Asp Leu Ser Val Glu Lys Asn Gln Gly Gly	
35 40 45	
Phe Asn Trp Arg Cys Pro Gly Cys Gln Ser Val Gln Leu Thr Ser Ser	
50 55 60	
Lys Asp Ile Arg Tyr Leu Cys Phe Cys Gly Lys Arg Pro Asp Pro Pro	
65 70 75 80	
Ser Asp Leu Tyr Leu Met Pro His Ser Cys Gly Glu Pro Cys Gly Lys	
85 90 95	
Pro Leu Glu Arg Asp Leu Gln Gly Asp Lys Glu Leu Leu Cys Pro His	
100 105 110	
Leu Cys Val Leu Gln Cys His Pro Gly Pro Cys Pro Pro Cys Lys Ala	
115 120 125	
Phe Ala Pro Pro Arg Leu Cys Pro Cys Gly Lys Lys Asn Ile Thr Thr	
130 135 140	
Arg Cys Ser Asp Arg Gln Ser Val Leu Thr Cys Gly Gln Arg Cys Gln	
145 150 155 160	
Lys Leu Leu Gln Cys Gly Arg His Arg Cys Gln Gln Ile Cys His Leu	
165 170 175	
Gly Pro Cys His Pro Cys Gln Val Pro Ile Asn Ala Ser Cys Phe Cys	
180 185 190	
Ala Gln Lys Met Glu Val Ile Leu Cys Gly Glu Met Ala Val Lys Gly	
195 200 205	
Glu Ile Arg Ala Asp Gly Gly Val Phe Ser Cys Gly Ser Thr Cys Gln	
210 215 220	
Lys Lys Leu Asn Cys Gly Asn His Ile Cys Ile Glu Thr Cys His Pro	
225 230 235 240	
Gly Ser Cys Gly Asp Cys Glu Leu Leu Pro Ser Arg Ile Lys Thr Cys	
245 250 255	
Cys Cys Gly Lys Thr Arg Leu Glu Glu Lys Arg His Ser Cys Leu Asp	
260 265 270	
Pro Ile Pro Thr Cys Ser Gln Val Cys Gly Lys Tyr Leu Pro Cys Gly	

275	280	285
Ile His His Cys Glu Glu Pro Cys His Ala Gly Asp Cys Ser Pro Cys		
290	295	300
Leu Val Leu Val Ser Gln Lys Cys Arg Cys Gly Ser Thr Ser Arg Thr		
305	310	315
Val Glu Cys Cys Lys Thr Lys Met Glu Asn Glu Lys Phe Thr Cys Glu		
325	330	335
Arg Pro Cys Gly Gln Lys Lys Asn Cys Gly Arg His Arg Cys Ser Glu		
340	345	350
Arg Cys Cys Pro Leu Ser Asn Pro Asn Asn Ile Leu Asn Ala Asp Trp		
355	360	365
Asp Pro His Phe Cys Gln Leu Pro Cys Gly Lys Lys Leu Arg Cys Gly		
370	375	380
Gln His Ala Cys Glu Ser Leu Cys His Ser Gly His Cys Pro Pro Cys		
385	390	395
Leu Glu Thr Ile Phe Thr Asp Leu Thr Cys Ala Cys Gly Lys Thr Ser		
405	410	415
Ile Pro Pro Pro Leu Pro Cys Gly Thr Pro Pro Pro Ser Cys Gln Leu		
420	425	430
Pro Cys Ser Val Pro Gln Pro Cys Ser His Pro Ala Ser His Ser Cys		
435	440	445
His Phe Gly Asp Cys Pro Pro Cys Ser Met Pro Ile Ala Lys Glu Cys		
450	455	460
Ile Gly Gly His Val Val Leu Arg Asn Ile Pro Cys Gly Ser Lys Asp		
465	470	475
Ile Lys Cys Asn Lys Leu Cys Gly Lys Thr Arg Gln Cys Gly Leu His		
485	490	495
Ala Cys Gly Arg Thr Cys His Leu Pro Pro Cys Asp Asn Leu Ser Ala		
500	505	510
Val Pro Gly Ile Arg Ala Ser Cys Gly Gln Thr Cys Gly Ala Pro Arg		
515	520	525
Arg Asp Cys Arg His Thr Cys Thr Ala Pro Cys His Pro Ser Thr Pro		
530	535	540
Cys Pro Asp Thr Arg Cys Lys Phe Pro Val Thr Ile Thr Cys Ser Cys		
545	550	555
	560	565
	570	575
Asn Tyr Asp Ala Asp Thr Val His Glu Ala Ser Ile Ile Gln Lys Leu		
580	585	590
Pro Val Leu Leu Gln Pro Val Ala Ala Asn Gly Lys Lys Val Pro Leu		
595	600	605
Gly Gln Arg Lys Leu Met Cys Asn Asp Asp Cys Ala Lys Leu Glu Arg		
610	615	620
Lys Arg Val Leu Ala Asp Ala Phe Glu Ile Thr Ala Pro Asn Leu Asp		
625	630	635
Ser Leu His Phe Gly Glu Asn Ser Val Ala Ser Glu Leu Leu Ala Asp		
645	650	655
Met Leu Arg Arg Asp Ser Lys Trp Val Leu Ser Val Glu Glu Arg Cys		
660	665	670
Lys Phe Leu Val Leu Gly Lys Ser Arg Gly Asn Ala His Gly Pro Lys		
675	680	685

Val His Val Phe Cys Pro Met Leu Lys Asp Lys Arg Asp Ala Val Arg
 690 695 700
 Val Ile Ala Glu Arg Trp Lys Leu Ala Val Asn Ala Ala Gly Arg Glu
 705 710 715 720
 Pro Lys His Phe Val Val Val His Val Thr Pro Lys Ser Arg Ala Pro
 725 730 735
 Ala Arg Val Leu Gly Phe Lys Gly Thr Thr Thr Val Asn Val Pro Leu
 740 745 750
 Pro Pro Ala Phe Asp Pro Leu Val Asp Met Asp Pro Arg Leu Val Val
 755 760 765
 Ser Phe Ile Asp Leu Pro Met Asp Ala Asp Ile Ser Ala Leu Val Leu
 770 775 780
 Arg Phe Gly Gly Glu Cys Glu Leu Val Trp Leu Asn Asp Lys Asn Ala
 785 790 795 800
 Leu Ala Val Phe Asn Asp Pro Ala Arg Ala Ala Thr Ala Met Arg Arg
 805 810 815
 Leu Asp His Gly Thr Val Tyr Gln Gly Ala Val Val Val Val Val Pro
 820 825 830
 Asn Val Gly Ala Ser Val Ala Ser Ser Ala Thr Asn Ala Trp Gly Gly
 835 840 845
 Ser Gly Thr Met Lys Gly Gly Ala Leu Ala Ala Leu Lys Ser Asn Pro
 850 855 860
 Trp Lys Lys Asp Val Ile Gln Glu Pro Gly Trp Arg Glu Asp Ala Trp
 865 870 875 880
 Gly Asp Glu Glu Trp Ala Thr Gly Ser Ala Asn Val Lys Leu Pro Ile
 885 890 895
 Gln Lys Lys Glu Ala Arg Ile Ser Ala Ser Val Asn Pro Trp Ser Val
 900 905 910
 Leu Asn Gln Glu Ser Ser Ser Ser Ser Val Ala Ala Ile Lys Ile
 915 920 925
 Asp Gly Ser Arg Lys His Ser Glu Ser Ser Val Ile Thr Lys Leu Glu
 930 935 940
 Pro Arg Asp Gly Gly Ser Asn Leu Gly Gly Gln Pro Ala Gly Asn Phe
 945 950 955 960
 Asp Ala Leu Glu Ala Ser Asp Val Val Asp Asp Trp Glu Lys Ala Cys
 965 970 975
 Glu

【0048】配列番号：3

配列の長さ：14

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他のDNA... 合成DNA

配列

TTTTTTTTT TTVG 14

【0049】配列番号：4

配列の長さ：14

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他のDNA... 合成DNA

配列

TTTTTTTTT TTVA 14

【0050】配列番号：5

配列の長さ：14

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他のDNA... 合成DNA

配列

TTTTTTTTT TTVT 14

【0051】配列番号：6

配列の長さ：14

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他のDNA... 合成DNA

配列

TTTTTTTTTT TTVC 14

【 0 0 5 2 】

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のDNA結合タンパク質をコードするcDNA（NF-X1）が有するシステインに富む7回の繰返し構造を示す図。各段の左右の数字はN-末端からのアミノ酸番号を表す。

【図1】

```

110          C-PHLCVLDCHPGPCPPCKAFAPRLCPC 137
155 CGQRCDKLLQCGRHRCQDICHLPCHPCQVPINASCFC 192
219 CGSTCDKYLNCGNHIC/ETCHPGSCGDCCELLPSRIKTC 256
277 CSQVCGKYLPCGIHHCEEPCHAGDCSPCLVLYSQKCRG 314
373 CQLPCGKKLRGQHACESLCHSGHCPPCLETIFTDLTC 410
483 CNKLCGKTRCGLHACGRTCHLPPCDNLSAVPGIRASC 520
531 C-RHTCTAPCH 540

```

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 Q 1/68

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 5/00

技術表示箇所

C

(72)発明者 太田 啓之

神奈川県横浜市緑区長津田4259 東京工業
大学生命理工学部内